

УДК 619.616.993.192

А.Г.Лебединська, студентка гр. ПБ-з71мп, Н.В.Стельмах, к.т.н., доц.
КПІ ім. Ігоря Сікорського

ІМУНОЛОГІЧНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРАМЕТРІВ КРОВІ У ТВАРИН

Анотація: У даній статті розглянуто одне з найпоширеніших інфекційних захворювань людей та тварин, а саме токсоплазмоз. В роботі наведені результати досліджень сироваток крові котів з метою виявлення специфічних антитіл до збудника токсоплазмозу. Було використано «Токсоплазма IgG-КС-ИФА» виробництва ТОВ «ХЕМА» тест-набір для виявлення IgG антитіл до *Toxoplasma gondii* у котів виробництва Росія.

Ключові слова: токсоплазмоз, діагностика, сироватки крові, імуноферментний аналіз, тест-система

ВСТУП

Toxoplasma gondii є облигатним внутрішньоклітинним паразитом, який здатний заразити не тільки людину але і широкий спектр домашніх і диких тварин. Токсоплазмоз - ендемічне захворювання з поширенням по всьому світу. Кішки і дикі тварини з сімейства котячих відіграють важливу роль в епідеміології цього захворювання, оскільки вони є дефінітивними господарями, що виділяють з фекаліями стійкі в навколишньому середовищі ооцисти (рис.1).

Основними факторами, які сприяють епідеміології токсоплазмозу є: значна кількість безпритульних котів; інтенсивна репродуктивна здатність токсоплазм і стійкість у зовнішньому середовищі ооцист, що виділяють коти; адаптація їх до широкого кола проміжних господарів; тривале перебування ооцист в організмі інвазованих тварин [1,2].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Комплексний життєвий цикл *T. gondii* включає в себе два етапи: 1) статеве розмноження паразита - здійснюється тільки у тварин сімейства котячих; 2) безстатеве розмноження - може проходити в організмі будь-якої теплокровної тварини, тобто ссавців (включаючи людину) і птахів (рис. 1).



Рисунок 1. Механізм передачі токсоплазм

Існують три інфекційних стадії (форма) паразит, здатний до зараження:

Спорулювання ооцисти. Спочатку ооцисти, що виділяються з фекаліями інфікованих кішок, неспорулювані, вони не контагіозні (не заразні). Однак у

навколишньому середовищі на 1-5 день залежно від температури і вологості відбувається їх спорулювання (наприклад 1 день - при 24 - 25 ° С, 5 днів - при 15 ° С і день 21 - 11 ° при температурі С). Бразіоїти («Brady» = повільно, грец.). Локалізуються в кістах різних тканин організму. Тахізоїти ("tachos" = швидкість, швидко, грец) - швидко діляться форми, які розмножуються практично в будь-яких клітинах проміжного господаря і епітеліальних клітинах (за винятком кишечника) остаточної (дефінітивних) господарів [3,4].

Лабораторні дослідження на токсоплазмоз здійснюють шляхом: виявлення і ідентифікації ендозоїтів, ооцист в патологічному матеріалі і ооцист токсоплазм в фекаліях методом мікроскопії; визначення специфічних антитіл в сироватці крові котів. Для індикації токсоплазм запропоновані сучасні імунохімічні і молекулярно-генетичні методи, зокрема імуноферментний аналіз, імуноблоттінг, гібридомні технології, полімеразна ланцюгова реакція та інші. Сьогодні виділяють два провідних способи виявлення токсоплазмоза у кішок. Це аналіз на антитіла до токсоплазми, який називається імуноферментним (ІФА), і ПЛР на токсоплазмоз (полімерна ланцюгова реакція). Встановлено, що ELISA-тест придатний для ретроспективної діагностики токсоплазмозу і значно перевершує загальноприйнятий метод дослідження сироватки крові в РЗК. За чутливістю ІФА в 5-10 разів, а за специфічністю у 2-3 рази перевершує РЗК. Призначення ПЛР полягає в виявленні часток ДНК паразитів. Частіше інших проводиться імуноферментний аналіз крові на токсоплазмоз. Він дозволяє виявляти фазу і час протікання хвороби. Виявити це вдається через виявлення імуноглобулінів IgM [5,6].

Метою роботи було визначення специфічних антитіл у сироватках крові клінічно хворих котів за допомогою діагностичного тест-системи «Токсоплазма IgG-КС-ИФА» виробництва ТОВ «ХЕМА», Росія, для виявлення концентрації антитіл класу G (IgG) до *Toxoplasma gondii*., в сироватці крові котятчих методом твердофазного імуноферментного аналізу (рис. 2).



Рисунок 2. Набір тест-система «Токсоплазма IgG-КС-ИФА»

Для проведення досліджень використали зразки сироваток крові котів старших 8 місяців. Для отримання сироватки зразки крові центрифугували та відбирали надосадову рідину, яку зберігали за температури 2-8 0C протягом 72 годин чи у замороженому виді за температури мінус 20 0C. Після розморожування зразки повторно центрифугували та використовували надосад для дослідження.

Для виявлення специфічних антитіл до збудників токсоплазмозу сироватки крові котів досліджували з використанням тест-системи «Токсоплазма IgG-КС-ИФА», виробництва ТОВ «ХЕМА», Росія, м. Москва, REF K101CF, LOT 7102, придатний до 2019-09, згідно настанови.

Величина оптичної густини (ОГ) вмісту комірок планшета вимірювалась на спектрофотометрі вертикального сканування ImmunoChem-2100 Microplate Reader User's Manual при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту комірок планшета здійснювалось протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Визначення антитіл класу G (IgG) до *Toxoplasma gondii* базується на використанні «сендвіч» -варіанті твердофазного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні комірок планшета іммобілізований антиген -*Toxoplasma gondii*. Антитіла із зразку зв'язуються з антигеном на поверхні комірки. Комплекс, що утворився виявляють за допомогою загальновидового кон'югату мишачих моноклональних антитіл до IgG з пероксидазою хрому. В результаті утворюється пов'язаний з пластиком «сендвіч», що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) відбувається фарбування розчинів в комірках. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації антитіл класу G (IgG) до *Toxoplasma gondii* в досліджуваному зразку. Концентрація антитіл класу G (IgG) до *Toxoplasma gondii* в досліджуваних зразках розраховується за формулою, наведеною в інструкції.

При проведенні досліджень з використанням «Токсоплазма IgG-КС-ИФА» тест-набір для виявлення IgG антитіл до *Toxoplasma gondii* у котів результати реакції оцінювали:

Якщо значення К лежить в інтервалі від 1.1 до «другого cut-off», це може свідчити або про початковий період первинної інфекції, або про інфекції, перенесеної раніше. Щоб прояснити ситуацію, необхідно досліджувати повторні зразки крові того ж обстежуваного, взяті через кілька тижнів. Наростання титру в повторному зразку свідчить про наявність інфекції. Якщо ж титр наростає, це свідчить про відсутність активної інфекції та про анамнестичних характер антитіл(рис 2.).

Исследуемая группа	Единицы, К	
	Нижний предел	Верхний предел
Серонегативные	<0.1	0.9
Серопозитивные	1.1	4.9

Рисунок 2. Очікувані значення і норми

За результатами досліджень з використанням «Токсоплазма IgG-КС-ИФА» тест-набір для виявлення IgG антитіл до *Toxoplasma gondii* у сироватках крові котів з клінічними ознаками (отити, кон'юнктивіти) старше 8 місяців встановлено позитивних зразків:

Негативний результат 0-0,69, 0,7 - 0,89 сумнівна, більше 0,9 – позитивний

ВИСНОВКИ

1. Діагностику на наявність збудників токсоплазмозу у сироватках крові котів з різними клінічними проявами інфекцій проводили за допомогою тест-системи «Токсоплазма IgG-КС-ИФА», виробництва ТОВ «ХЕМА», Росія, м. Москва, REF K101CF, LOT 7102, придатний до 2019-09, згідно настанови.

2. Метод виявився високоефективним за допомогою якого в сироватках крові котів можна кількісно виявляти специфічні антитіла до токсоплазмозу.

3. Встановлено поширення збудників *Toxoplasma gondii* серед котів з різними клінічними ознаками інфекції.

4. При проведенні досліджень сироваток крові від котів старше 9 місяців з клінічними ознаками (отити, кон'юнктивіти, діарея) виявлено позитивних сироваток: на токсоплазмоз – 23,5 %, в тому числі титри становили 1,1 – 1,9 - 17,2% та більше 1,9 – 6,3 % досліджуваних.

5. Важливо проводити вимірювання титрів антитіл до токсоплазми у котенят старших 4 місяців, щоб виключити клостральний імунітет і наявність антитіл у кішки-матері, які не будуть діагностичними для маленьких котенят.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Березовський А. В., Якубчак О. М., Галат В. Ф. Діагностика токсоплазмозу тварин // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. — Львів, 2014. — Вип. 15, № 1. — С. 221–224.

2. Мороз, Б.В. Принципы диагностики и лечения токсоплазмоза /Б.В.Мороз и др.. // Мед. Паразитология. 1984. - №5. - С. 44-47.

3. Урбанович П. П., Потоцький М. К. Патологічна анатомія тварин. — Київ, 2008. — С. 665–666, 833–835

4. Крик Р., Бонагура Д. Современный курс ветмедицины. — Москва: КИРКА, 2005. — С. 339–340, 1134–1135.

5. Dubey J. P. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from tissue sandfeces of cats from Addis Ababa, Ethiopia / J. P. Dubey, C. Darrngton, N. Tiao et al. // America Society of Parasitologists: Journal of parasitology. — 2013. — № 99, Vol.1. — P. 56–58.

6. Taylor M. A., Coop R. L., Wall R. L. Veterinary Parasitology. Blackwell — 2007. — 3rd.eddition. — P. 431–432.

Науковий керівник – к.т.н., доцент Стельмах Н.В.